

Title: **JP61152281A2: MOUSE HUMAN HYBRIDOMA CAPABLE OF PRODUCTION AND PREPARATION AND USE THEREOF**

Country: **JP Japan**
Kind: **A**

Inventor(s): **SAWADA SHUZO
KAWAMURA TAKASHI
MASUYASU YASUHIKO
TOMIBE KATSUHIKO**

Applicant/Assignee: **TEIJIN LTD**



News, Profiles, Stocks and More about this company

Issued/Filed Dates: **July 10, 1986 / Dec. 26, 1984**

Application Number: **JP1984000273156**

IPC Class: **C12N 5/00; A61K 39/395; C12N 15/00; C12P 21/00; G01N 33/569; G01N 33/577; C07K 1**

Priority Number(s): **Dec. 26, 1984 JP1984000273156**

Abstract: **Purpose:** To produce the titled mouse-human hybridoma capable of producing anti-Pseudomonas diagnosis and remedy of infections diseases with Pseudomonas aeruginosa antibody with m
Constitution: A human tissue rich in the cell capable of producing anti- Pseudomonas aeruginosa antibody and the cell of the tissue is fused with mouse myeloma cell. A monoclonal anti-Pseudomonas antibody bonding to e.g. the lipopolysaccharide (LPS) of Pseudomonas aeruginosa can be separated from the culture obtained by the cultivation of the hybridoma.
COPYRIGHT: (C)1986,JPO&Japio



Family:

Patent	Issued	Filed	Title
WO8603754A1	July 3, 1986	Dec. 20, 1985	ANTI-PSEUDOMONAS AERUGINOSA HYBRIDOMA
JP61155398A2	July 15, 1986	Dec. 28, 1984	ANTI-PSEUDOMONAS AERUGINOSA HYBRIDOMA CONTAINING SAID ANTIBODY AS ACTIVE INGREDIENT
JP61152281A2	July 10, 1986	Dec. 26, 1984	MOUSE HUMAN HYBRIDOMA CAPABLE OF PRODUCING ANTI-PSEUDOMONAS AERUGINOSA ANTIBODY AND PREPARATION AND USE THEREOF
JP61152280A2	July 10, 1986	Dec. 26, 1984	TRANSFORMED CELL CAPABLE OF PRODUCING ANTI-PSEUDOMONAS AERUGINOSA ANTIBODY AND PREPARATION AND USE THEREOF
JP3061428B4	Sept. 19, 1991	Dec. 28, 1984	KORYOKUNOKINHITOMONOKUROON, KORYOKUNOKINHITOKOTAIOSANSEI, KORYOKUNOKINHITOKOTAIOSANSEI, KORYOKUNOKINHITOKOTAIOSANSEI
JP3055106B4	Aug. 22, 1991	Dec. 26, 1984	KORYOKUNOKINHITOKOTAIOSANSEI, KORYOKUNOKINHITOKOTAIOSANSEI, KORYOKUNOKINHITOKOTAIOSANSEI, KORYOKUNOKINHITOKOTAIOSANSEI
EP0233289B1	March 10, 1993	Dec. 20, 1985	HYBRIDOMAS PRODUCING ANTI-PSEUDOMONAS AERUGINOSA ANTIBODY
EP0233289A1	Aug. 26, 1987	Dec. 20, 1985	ANTI-PSEUDOMONAS AERUGINOSA HYBRIDOMA
DE3587178T2	July 22, 1993	Dec. 20, 1985	HUMANER MONOKLONALER ANTIKORPER GEGEN PSEUDOMONAS AERUGINOSA PRODUZIERENDE HYBRIDOMEN.
DE3587178C0	April 15, 1993	Dec. 20, 1985	HUMANER MONOKLONALER ANTIKORPER GEGEN PSEUDOMONAS AERUGINOSA PRODUZIERENDE HYBRIDOMEN.
AU5309386A1	July 22, 1986	Dec. 20, 1985	ANTI-PSEUDOMONAS AERUGINOSA HYBRIDOMA
AU0597877B2	June 14, 1990	Dec. 20, 1985	ANTI-PSEUDOMONAS AERUGINOSA HYBRIDOMA
AT0086634E	March 15, 1993	Dec. 20, 1985	HUMANER MONOKLONALER ANTIKORPER GEGEN PSEUDOMONAS AERUGINOSA PRODUZIERENDE HYBRIDOMEN.

13 family members shown above

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-152281

⑤ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和61年(1986)7月10日

C 12 N 5/00
A 61 K 39/395
C 12 N 15/00

7115-4B

8214-4C

7115-4B ※審査請求 未請求 発明の数 3 (全7頁)

⑭ 発明の名称 抗緑膿菌ヒト抗体を産生するマウス-ヒトハイブリドーマ及びその製造法並びにその使用方法

⑮ 特 願 昭59-273156

⑯ 出 願 昭59(1984)12月26日

⑰ 発 明 者 沢 田 周 三 日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社生物医学研究所内

⑰ 発 明 者 河 村 隆 日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社生物医学研究所内

⑰ 発 明 者 増 保 安 彦 日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社生物医学研究所内

⑰ 出 願 人 帝 人 株 式 会 社 大阪市東区南本町1丁目11番地

⑰ 代 理 人 弁 理 士 前 田 純 博

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

抗緑膿菌ヒト抗体を産生するマウス-ヒトハイブリドーマ及びその製造法並びにその使用方法

2. 特許請求の範囲

1. ヒトの抗緑膿菌抗体産生細胞とマウスのミエローマ細胞とを融合させて得られた、抗緑膿菌ヒト抗体を産生するマウス-ヒトハイブリドーマ及びそれに由来する細胞株。
2. 産生される抗緑膿菌ヒト抗体が緑膿菌のリボ多糖を認識する抗体である、特許請求の範囲第1項記載のマウス-ヒトハイブリドーマ及びそれに由来する細胞株。
3. 産生される抗緑膿菌ヒト抗体が、リボ多糖のO-多糖側鎖を認識する抗体である、特許請求の範囲第2項記載のマウス-ヒトハイブリドーマ及びそれに由来する細胞株。
4. 産生される抗緑膿菌ヒト抗体が緑膿菌の1型、

5型、7型、8型及び10型のいずれかの血清型を認識する抗体である、特許請求の範囲第3項記載のマウス-ヒトハイブリドーマ及びそれに由来する細胞株。

5. 産生される抗緑膿菌ヒト抗体がIg G抗体、Ig M抗体又はIg A抗体である、特許請求の範囲第1項乃至第4項のうちいずれか1項記載のマウス-ヒトハイブリドーマ及びそれに由来する細胞株。

6. ヒトの抗体産生細胞が扁桃腺又は脾臓から採取された細胞である、特許請求の範囲第1項記載のマウス-ヒトハイブリドーマ及びそれに由来する細胞株。

7. ヒトの抗体産生細胞組織から抗緑膿菌抗体を産生する細胞を多く含む組織を選別し、次いで該組織の細胞とマウスのミエローマ細胞とを融合させることを特徴とする、抗緑膿菌ヒト抗体を産生するマウス-ヒトハイブリドーマの製造法。

8. 増殖せしめた細胞から抗緑膿菌ヒト抗体を得

るために、増殖用の細胞として、ヒトの抗緑膿菌抗体産生細胞とマウス・ミエローマ細胞を融合させて得られた、抗緑膿菌ヒト抗体を産生するマウス・ヒトハイブリドーマ及び／又は該ハイブリドーマに由来する細胞株を使用することを特徴とする方法。

3. 発明の詳細な説明

(i) 産業上の利用分野

本発明は、抗緑膿菌ヒト抗体を産生するマウス・ヒトハイブリドーマとその製造法、並びにその使用方法に関する。その目的とするところは、緑膿菌感染症の診断及び治療等に役立つところの抗緑膿菌ヒト抗体を産生する、マウス・ヒトハイブリドーマを提供することにある。

(ii) 従来の技術

緑膿菌（シュードモナス・エルギノース、*Pseudomonas aeruginosa*）は本来病原性の低い菌であるが、最近、抗生物質の投与による菌交代性増殖の結果、薬剤耐性緑膿菌による感染症が増え、しばしば免疫不全、とりわけシスティック・ファ

イブローシス（のう胞性線維症）、熱傷、ガン等の患者に発症し重篤な症状を呈するようになってくる。この感染症においては、緑膿菌が薬剤耐性をもっていることが多いため、又患者の免疫力が弱まっている等のため、抗生物質による治療が必ずしも十分な威力を発揮しないという問題がある。従って、抗緑膿菌抗体によるいわゆる免疫療法が考えられ研究されつつあるが、未だ臨床に供されるに至っていない。また、緑膿菌感染症の治療を適格に行なうためには、その早期診断が必要であるが、従来の抗血清を用いる方法は満足すべき状況にないという問題がある。これらの問題点を解決するためには、抗緑膿菌モノクローナル抗体が必要である。

一方、緑膿菌の表面抗原としては、リポ多糖（LPS）、外膜蛋白（outer membrane protein, OMP）、ペン毛、スライム由来の多糖等が知られている。このうちLPSは緑膿菌の血清型を決定するO-多糖側鎖を有し、今まで1から16までの16種類の血清型（Hommaの分類による）が知ら

- 3 -

れている。LPSはO-多糖側鎖の他にコアリージョン、リビドAを有し、リビドAが緑膿菌の外膜（outer membrane）にうずもれ、これより2-ケト-3-デオキシオクトン酸を介しコアリージョンが外膜外に伸び、コアリージョンからO-多糖側鎖が更に外側に伸展している。LPSに対する抗体は、ヒトや動物において作られやすく、感染防御的に働く事が知られている。抗LPS抗体は緑膿菌のLPSと結合し、この抗原抗体複合体に補体が結合し、免疫溶解を受けるか、もしくは多形核白血球などの食細胞により処理され、生体が緑膿菌感染症から免がれる事ができると言われている。緑膿菌の感染が成立している患者では、緑膿菌抗原が多く、抗LPS抗体が不足になりがちである。これを防ぎ治療するために、従来からヒトの血液から調製したIgG製剤が使われてきたが、その製剤に含まれている緑膿菌の抗体価は極めて少なく、感染治療上十分ではなかった。

ところで、細胞融合の技術を用いて、特異的な

- 4 -

抗体を産生するがやがては死滅する運命にあるリンパ球又はB細胞（抗体産生細胞）と、培養器の中で永久に増殖しつづけるミエローマ細胞（骨髄腫細胞）を融合させることにより、モノクローナルを永続的に産生分泌するハイブリドーマ（融合細胞）株を樹立させる方法は公知である。そして、モノクローナルな抗緑膿菌抗体を得ようとする場合には、抗緑膿菌抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させ、クローニングによって抗緑膿菌抗体産生性のハイブリドーマを得ればよいことは一般論としては知られている。そして、具体的には、例えば、特開昭59-29622号公報には、緑膿菌のLPSで免疫されたBALB/Cマウスの脾臓細胞（抗体産生細胞）と、マウス・ミエローマ細胞（P3-X63-Ag8-U1株）とを融合させハイブリドーマを得、これをクローニングすることによって、モノクローナルな抗緑膿菌マウス抗体を産生するハイブリドーマを得たことが開示されている。

(iii) 発明が解決しようとする問題点

- 5 -

- 6 -

以上のごとく、抗緑膿菌抗体を産生するハイブリドーマに関しては、具体的な成功例は抗緑膿菌マウス抗体を産生するマウス-マウスハイブリドーマだけである。しかし、ヒトの病気の診断や治療のためには、同種タンパクである抗緑膿菌ヒト抗体の方が有用でかつ安全であり、そのためには、ヒトの抗体産生細胞を用いてマウス-ヒトハイブリドーマやヒト-ヒトハイブリドーマを樹立する必要がある。しかしながら、動物の場合と異なり、ヒトの場合には、ヒトをあらかじめ多量の緑膿菌やその表面抗原で免疫し、有効に刺激された抗体産生細胞を採取して細胞融合に用いるといった方法をとるわけにはいかないで、適切な抗体産生細胞の採取・調整が困難であるといった問題等があり、未だ明確な成功例の報告がない。

(二) 問題点を解決するための手段

本発明者らは、抗緑膿菌ヒト抗体を産生するマウス-ヒトハイブリドーマを得ることを目的として鋭意研究を行なった結果、まず、抗緑膿菌抗体を産生するヒトの細胞を多く含む組織を選別し、

この組織の細胞とマウスのもミエローマ細胞とを融合させるという方法によって、抗緑膿菌ヒト抗体を産生するマウス-ヒトハイブリドーマを得ることができた。

本発明においてヒトの抗体産生細胞とは、ヒトのリンパ球（又はB細胞）であって、抗体を分泌している又は分泌する能力を持った細胞をいう。これは脾臓、リンパ節、末梢血、骨髄、扁桃、アデノイド等の細胞の中に含まれている。本発明の目的のためには、いかなるソースのリンパ球でも用いることができるが、好ましいのは扁桃腺又は脾臓から採取されたものである。

マウスのもミエローマ細胞としては、8-アザグアニン耐性株を用いるのが有利であり、公知のものとしては、BALB/cマウスのP3-X63-Ag8、P3-X63-Ag8-U1、P3-NS1/1-Ag4-1、P3-X63-Ag8-6.5.3、SP2/O-Ag14、FO、MPC11-45.6TG1.7などがある。

本発明においては、抗原としては、緑膿菌の表

- 7 -

面抗原のうちどれを用いても良いが、以下LPSを用いた場合について説明する。まず、抗原である特定のLPSを有する緑膿菌を選ぶ。次にヒトのリンパ球を扁桃腺、リンパ節、脾臓及び末梢血等の組織からモノクリアーセル（単核細胞）として調製する。モノクリアーセルを5日～7日、ボークウイードマイトジエン等のマイトジエンの添加もしくは無添加の条件下で、5%CO₂インキュベーターで培養し、その培養上清液中の抗体を、緑膿菌を固定したプレートで酵素抗体法（ELISA）により測定し、望ましいモノクリアーセルを含む組織を選ぶ。次いで、この組織のリンパ球とマウスのもミエローマ細胞を融合させ、ハイブリドーマの異質集落を形成させる。細胞融合は公知の方法で行なうことができる。例えば、抗体産生細胞ともミエローマ細胞を10:1～1:10、好ましくは1:1～1:3の比率で混合し、適当な細胞融合用溶液、例えば約35%ポリエチレングリコール（分子量1,000～6,000程度）および約7.5%ジメチルスルホキシドを含むRPMI

- 8 -

1640を加えて、室温～37℃で1～数分間攪拌し、その後10%FCS加RPMI1640で徐々に希釈し、洗浄の後HAT（ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン）選択培養液にて細胞濃度が1～5×10⁵個/皿となるように調整する。これを0.2mlずつ、例えば96穴プレートに分注し、5%CO₂を含む空気中で35～38℃で2～3週間培養する。HAT培養液中ではハイブリドーマのみが生存し、8-アザグアニン耐性のもミエローマ細胞及びもミエローマ同士の融合細胞は生存し得ない（未融合の抗体産生細胞は数日で死滅する）。次に、このハイブリドーマ集落から、緑膿菌LPSに対し特異的なヒトモノクローナル抗体を分泌するものだけ選別する。この選別工程（クローニング）は、異なるハイブリドーマより産生されたヒトモノクローナル抗体を、目的とする血清型を有する緑膿菌又は緑膿菌LPSを固定したプレートを用いて、酵素抗体法を用いて行なう事ができる。全ての緑膿菌の血清型に反応するヒトモノクローナル抗体を得る為には、16種類の異なる血清型の緑

- 9 -

- 10 -

膿菌を使用しなくてはならない。これらの緑膿菌は、アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)等から入手できる。

次に、選択したハイブリドーマを培養して、所望の特異的ヒトモノクローナル抗体を生成させる。

クローニングによって選択された、本発明の抗緑膿菌ヒト抗体を産生するマウスーヒトハイブリドーマは、凍結して保存することができ、また、これを適当な方法で大量に培養することもできる。かかるセルライン(細胞株)又は複製された細胞も本発明の範囲に含まれるものである。また、クローン化されたハイブリドーマと実質的に同一の抗緑膿菌ヒト抗体を産生する限り、その変異株等も本発明の範囲に含まれる。

(6) 発明の効果

本発明のハイブリドーマを、適当な方法で大量に培養すると、培養上清から、例えば、緑膿菌のLPSに特異的に結合するモノクローナルな抗緑膿菌ヒト抗体を得ることができる。また、このハイブリドーマを動物に移植して腫瘍化し、その腹

水や血清から抗緑膿菌ヒト抗体を得ることもできる。抗緑膿菌ヒト抗体の精製は、モノクローナル抗体を用いるアフィニティクロマトグラフィー等の方法によって行なわれる。

本発明のハイブリドーマは、緑膿菌の、例えばLPSに特異的に結合するヒトモノクローナル抗体を提供し、かかる抗緑膿菌抗体は、緑膿菌感染症の患者に投与する事により、血中に抗LPS抗体の力価を有意に上昇せしめ、治療を達成する事ができる。また、モノクローナル抗体は、高い精度と信頼度をもつ緑膿菌の検査試薬や標識試薬などに応用ができる。

(7) 実施例

以下、実施例により本発明を詳述する。

実施例 1

(1) 抗緑膿菌抗体産生細胞の選別

8人の扁桃炎患者より8ロットの扁桃腺を得、これよりファイコールバックを用いモノヌクリアーセルを調製した。細胞濃度が 5×10^5 / ml にな

- 1 1 -

る様に、モノヌクリアーセルを培養液A(RPMI 1640+10%胎児牛血清+2 mMグリタミン+1 mMピリジン酸+0.02 mg/mlセリン+80 μ g/mlゲンタマイシン)に浮遊させ、これに、ボークウイードマイトジエン(PWM)を20 μ g/mlになる様に加えた。この試料を200 μ lずつ培養プレートに入れ、CO₂インキュベーター(5%CO₂)で6~7日培養した。その後、それぞれの培養上清液100 μ lを、緑膿菌をコートしたプレートに移し、ELISAで測定を行ったところ、1ロットだけ強く抗緑膿菌抗体を産生していた。このロットのモノヌクリアーゼを、マウスミエローマP3-X63-Ag8-U1(以下P3U1と略記する)との細胞融合に用いた。

(2) 細胞融合

前もってP3U1を培養液A中で培養しておいた。使用時の細胞濃度は 6×10^5 個/mlであった。上記の抗緑膿菌抗体産生がすぐれていた扁桃腺ロットのリンパ球とP3U1を、それぞれ別々に無血清RPMI 1640で2回洗浄した。そして、リン

- 1 2 -

パ球と 5×10^5 個のP3U1とを試験管の中で一緒にし、次いで1500rpmで5分間遠心し、上清を捨てた。細胞ペレットを、試験管をたたくことによって、よく分散させた。これに0.5mlのポリエチレングリコール液(RPMI 1640 5.75 ml+ポリエチレングリコール500 3.5 ml+ジメチルエルホキサイド 0.75 ml)(PEG液と略記する)を加えて、細胞をゆるやかに浮遊させた。1分後に0.5ml+RPMI 1640を加え、さらに1分後に1 ml RPMI、さらに2分後に4 mlのHAT培養液(RPMI 1640+20%胎児牛血清+80 μ g/mlゲンタマイシン+95 μ Mヒポキサンチン+0.4 μ Mアミノプテリン+1.6 μ Mチミジン)、さらに2分後には4 mlのHAT培養液を加えた。最後に、HAT培養液で25ml細胞浮遊液とした。これを培養プレート(96穴)1枚に蒔いて、37℃、5%CO₂含有空気中で培養した。一週間毎に半量の培養液を新しいHT培養液(HATからAを除去したもの)で交換していきハイブリドーマを得た。

- 1 3 -

- 1 4 -

(3) クローニング及び培養

得られたハイブリドーマの上清を、ホルマリン死滅緑膿菌をコーティングしたプレートを用いてE L I S A法で測定を行った結果、緑膿菌血清型Homma type5に結合するヒトモノクローナル抗体P3を得た。そこで、P3を産生するハイブリドーマを、2回限界希釈法によりクローニングを行い(96穴プレート2枚)、最終的にP3D9というヒトモノクローナル抗体(IgG, λ)を産生するマウス-ヒトハイブリドーマを得た。

本ハイブリドーマを、無血清培地R D F / T E S培地(Proc. Natl. Acad. Sci. U S A vol. 79, 1158-1162参照)1 μ lで培養を行い、P3D9を含む培養液を限外濾過膜P M 30(アミコン社製)を用いて濃縮を行い、30 μ lとした。そして、D E A E - S ephacelでカラムクロマトを行い、P3D9を精製し、12 μ gを得た。

実施例2

ヒトの脾細胞を用いる以外は、実施例1の場合

- 1 5 -

により抽出したL P S及びその熱処理(100 $^{\circ}$ C-30分) L P Sをコーティングしたプレートを用いたE L I S A法で、それぞれのL P Sに結合する事が認められ、L P Sを認識するモノクローナル抗体である事がわかった。

実施例3

ヒトの扁桃腺細胞を用い、実施例1の場合と同様にして、抗体産生細胞の選別及び細胞融合を行なった。得られたハイブリドーマの上清を、ホルマリン死滅緑膿菌をコーティングしたプレートを用いてE L I S A法で測定を行った結果、緑膿菌血清型Homma type1に結合する31-7, 同type7に結合する31-8, 同type8に結合する31-9, 及び同type10に結合する31-12を得た。これらのヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、限界希釈法及び軟寒天法により2回クローニングを行い(96穴プレート5枚)、それぞれ31-7-2A, 31-8-5G, 31-9-F4, 31-12-H3のヒト型IgGを産生するハイブリド-

- 1 7 -

と同様にして、抗体産生細胞の選別及び細胞融合を行なった。得られたハイブリドーマの上清を、ホルマリン死滅緑膿菌をコーティングしたプレートを用いてE L I S A法で測定を行った結果、緑膿菌血清型Homma type2, Homma type7, Homma type13のいずれとも結合するヒトモノクローナル抗体B8を得た。B8を産生するハイブリドーマを、2回限界希釈法によりクローニングを行い、B8E2というヒトモノクローナル抗体(IgG, λ)を産生するマウス-ヒトハイブリドーマを得た。

本ハイブリドーマを、10% F C S R P M 1640 1 μ lで培養を行い、B8E2を硫酸沈澱(50%飽和)により回収した。D E A E - S ephacelで部分精製を行った。ヒトIg量は、一元平板免疫拡散法(S R I D)により定量を行い、8 μ gのB8E2を含む抗体溶液を得た。本モノクローナル抗体は、Homma type2, Homma type7及びHomma type13から、Johnson and Perry(Can. J. microbiol. 1976 vol.22, 29-34)の方法

- 1 6 -

マを得た。

かかるハイブリドーマを実施例2と同様の方法で培養し、部分精製を行い、それぞれのモノクローナル抗体が反応する抗原部位を決定すべく、L P S及熱処理(100 $^{\circ}$ C \times 2hr) L P Sとの結合性をE L I S A法により実施した。その結果を第1表に示した(反応時間は60分)。

(以下余白)

- 1 8 -

第 1 表

	Honna type 1		Honna type 7		Honna type 10		Honna type 8	
	LPS	熱処理 LPS	LPS	熱処理 LPS	LPS	熱処理 LPS	LPS	熱処理 LPS
31-7-2A	1.5*	1.5	0	0	0	0	0	0
31-8-5G	0	0	1.3	1.2	0	0	0	0
31-12-H3	0	0	0	0	1.1	1.1	0	0
31-9-F4	0	0	0	0	0	0	1.2	1.2

* 表中の数字はELISAのスコアである。

-19-

LPSとの結合性をELISA法により検討した。
その結果を第2表に示した。

(以下余白)

第3表から、ヒトモノクローナル抗体はそれぞれ特異なLPSに結合していることがわかる。

実施例4

ヒトの扁桃腺細胞を用いて、実施例1の場合と同様に抗体産生細胞の選別及び細胞融合を行った。得られたハイブリドーマの上清を、ホルマリン死滅緑膿菌をコーティングしたプレートを用いて、第2次抗体をヤギ抗ヒトIgM抗体(アルカリフォスファターゼ標識)として、ELISA法による測定を行った結果、血清型がHonna type 5, type 7, type 8に反応するIgM型ヒトモノクローナル抗体が得られた。これらのヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、限界希釈法及び軟寒天法により2回クローニングを行い、それぞれ、313-a, 313-b, 313-cのヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得た。その後、実施例2と同様の方法により部分精製を行い、それぞれのモノクローナル抗体が反応する抗原部位を決定すべく、LPS及び熱処理

- 20 -

第 2 表

	type 5		type 7		type 8	
	LPS	熱LPS	LPS	熱LPS	LPS	熱LPS
313-a	1.3*	1.2	0	0	0	0
313-b	0	0	0.9	0.9	0	0
313-c	0	0	0	0	1.1	1.0

* 表中の数字は基質反応60分後のELISAのスコアである。

- 21 -

-464-

-22-

実施例 5

第 3 表

緑膿菌敗血症患者の末梢リンパ球を用いて、実施例 1 の場合と同様に細胞融合を行ない、スクリーニングにより Homa type 5 にのみ反応するヒト Ig A モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ 4 H 11 D 10 を得た。4 H 11 D 10 は血清型 type 5 の 9 つの株にはすべて反応した。結果は第 3 表に示した。

type 5 に属する株 ヒト MCA	O-56	O-100	O-101	C12	N 2	1127	1237	1266	2781
4 H 11 D 10	*	0.4	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.4	0.5

* 表中の数字は基質反応 30 分後の ELISA のスコアである。

(以下余白)

特許出願人 帝人株式会社

代理人 弁理士 前田 純 博



- 23 -

- 24 -

第 1 頁の続き

⑤ Int. Cl. 4	識別記号	庁内整理番号
C 12 P 21/00		7235-4B
G 01 N 33/569		7906-2G
		7906-2G
// C 07 K 15/04		
(C 12 N 5/00		
C 12 R 1:91)		
(C 12 P 21/00		
C 12 R 1:91)		

⑦発明者 富部 克彦 日野市旭が丘 4 丁目 3 番 2 号 帝人株式会社生物医学研究所内